

**Über die Einführung eines modernen
Adenosintriphosphorsäure-Test in die
klinische Praxis**

Michael Sendtner

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 21777

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

ÜBER DIE EINFÜHRUNG EINES MODERNEN
ADENOSINTRIPHOSPHORSÄURE-TEST
IN DIE KLINISCHE PRAXIS

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Sendtner
aus
Herrsching



München 1958

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Professor Dr. STUHLFAUTH

Mitberichterstatter : Professor Dr. SEITZ

Dekan : Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1958

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der in der Arbeit benutzten Literatur

Seite

Einleitung

1

1. THEORETISCHE EINLEITUNG

2

1.1. Allgemeines

2

1.2. Chemische Eigenschaften

3

1.3. Technische Herstellung

4

Herrn Professor Dr. K. Stuhlfauth sei hier für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates, Herrn Priv. Doz. Dr. W. Lamprecht von der Technischen Hochschule München - Organisch-Chemisches Institut - für die liebenswürdige Unterstützung bei Durchführung der Testverfahren herzlich gedankt.

2. EXPERIMENTELLE ARBEIT

5

2.1. Darstellung des Rohproduktes

5

2.2. Reinigung

6

2.3. Eigenschaften des Rohproduktes

6

3. ANALYSE UND CHARAKTERISIERUNG

7

3.1. Elementaranalyse

7

3.2. Molekulargewicht

8

3.3. Schmelzpunkt

8

3.4. Löslichkeit

9

3.5. Kristallform

9

3.6. Dichte

10

3.7. Brechungsindex

10

3.8. Viskosität

11

4. Zusammenfassung

12

5. Literaturverzeichnis

13

6. Zusammenfassung

14

7. Schluss

15



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	7
I Theoretisch- literarischer Teil	8
A.) Extraktionsmethoden	8
B.) Chemische Bestimmungs-Methoden	9
C.) Colorimetrische und photometrische Bestimmungen	10
D.) Elektrophoretische Bestimmungsmethoden	11
E.) Bestimmungen mittels Ionenaustauscher-Chromatographie	11
F.) Bestimmungsmethoden mittels Papierchromatographie	12
1.) Lokalisation und Erkennung	13
2.) Differenzierung	13
3.) Quantitative Bestimmung	14
4.) Lösungsmittel	14
G.) Enzymatische Bestimmungsmethoden	15
Struktur der Adenylsäuren	18
Die Rolle der ATP im Fructosestoffwechsel	18
II Eigene Untersuchungen	19
A.) Zur Methodik	19
a.) Bestimmung von ATP aus Blut oder Serum	19
b.) Bestimmung von ATP aus organischem Material	20
B.) Erfahrungen und Kritik der Methodik	23
C.) Testergebnisse	25
Leistungsfähigkeit	31
Endurteil über den Test	31
Zusammenfassung	32
Literatur	33

Einleitung

Im Jahre 1956 sollte in der hiesigen Medizinischen Universitäts-Poliklinik, eine Testmethode für quantitative Adenosintriphosphorsäure-Bestimmung aus Blut und Organewebe eingeführt werden.

Wie aus der nachfolgenden Literatur ersichtlich bot sich dafür eine Fülle von Möglichkeiten an. Die zur Debatte stehenden Testverfahren hatten zumeist den Nachteil übergrosser Kompliziertheit, ergaben Missweisungen bis zu 10 % und liessen zudem eine Kontrolle der Testergebnisse selbst nach einigen Stunden nur mit grosser Ungenauigkeit zu. Es ergab sich nach kurzer Erprobung anderer Testverfahren, dass die Gruppe der Enzymatisch-optischen Testverfahren die allein geeignete sein würde. Zu gleicher Zeit war im Organisch-Chemischen-Laboratorium der Technischen Hochschule München, von Dr. W. Lamprecht und seinen Mitarbeitern, ein ausserordentlich spezifischer ATP-Test auf den Grundlagen von O. Warburg und A. Kornberg entwickelt worden. Er ergab nach kurzer Einarbeitung ausserordentlich exakte Ergebnisse, die sich auch bei mehrmaliger Prüfung nur in sehr engen Grenzen bewegten. Die zudem in Amerikanischen Laboratorien und Kliniken mit ähnlichen Testverfahren gemachten Erfahrungen, ermutigten zu einem Versuch der Einführung des Testverfahrens von W. Lamprecht in die Klinische Praxis.

Im Folgenden sollen verschiedene Extraktions- und Bestimmungsmethoden für Adenosintriphosphorsäure und ähnliche Adenylsäurederivate beschrieben werden, die aus der Literatur entnommen wurden.

I THEORETISCH-LITERARISCHER TEIL

A.) Extraktionsmethoden

Wichtig für das Ergebnis bei der Bestimmung der Nucleotidderivate ist die Methode der Extraktion. Dabei muss man sowohl zur Anreicherung als auch gegebenenfalls zur Reinigung der zu bestimmenden Derivate schreiten. Zur Extraktion der säurelöslichen, niedrigmolekularen Nucleotide aus organischem Material dient eiskalte 2 %ige Trichloressigsäure (37, 38). Die hochmolekularen Nucleinsäuren im Rückstand können nach Entfettung mit heisser Alkohol-Aether-Mischung getrennt bestimmt werden. (39, 40, 41). Ogur und Rosen (42) extrahieren die Mono-Nucleotide nach Alkohol-Aether-Behandlung mit 0,2 n Perchlorsäure bei 0 Grad Cels., während 1 n- Säure in der Kälte die Ribo-, und 0,5 n- bei 70 Grad Cels. die Desoxyribonucleinsäuren hydrolytisch löst.

Holzer und Mitarbeiter fanden, dass nur 5 - 6 %ige Trichloressigsäure DPN, ATP, ADP, AMP aus Organen quantitativ herauslöst (43). Zur Freilegung sämtlicher Purine und Pyrimidine aus Nucleinsäuren oder aus Nucleosid- und Nucleotidmischungen wird das gegebenenfalls vorbehandelte Material in der Hitze mit 70 %iger Perchlorsäure hydrolysiert (44).

Zur Bestimmung einzelner Verbindungen wird man im allgemeinen Fällungsreaktionen anschliessen, die auf der verschiedenen Löslichkeit ihrer Ba-, Ca-, Ag-, Mn-, Mg-, Hg-, U- und Pb- Salze beruhen. So werden anorganische Phosphate, Inosin- und Adenosin- Polyphosphate bei p_H 8 mit Ba- oder Ca-Acetat-Lösung gefällt, wobei die entsprechenden organischen Monophosphate in Lösung bleiben. Dieses Prinzip wurde von Larson (45) für die Bestimmung von AMP und ATP im Blut benutzt. Ein allgemeines Fraktionierungsschema unter Anwendung von Bariumfällungen mit Alkoholzusatz, schlugen Umbreit und Mitarbeiter (46) vor. Bei den üblichen Ausfällungen von Bariumsulfat aus Bariumsalzlösungen von ATP und ADP ist unter Umständen mit ATP-Verlusten bis zu 20 % zu rechnen.

B.) Chemische Bestimmungsmethoden

Von den älteren qualitativen Nachweisreaktionen, die zur Unterscheidung einzelner Purin- und Pyrimidin- Verbindungen dienten, sei hier die Kossel'sche Probe (Purpurrotfärbung von Adenin mit Zink- und Salzsäure) (47), die Xanthinprobe, die Diazobenzolsulfosäure- (48) und die Weidel'sche Reaktion (Violett-färbung nach Behandlung mit Chlor und NH_3) genannt.

Quantitativ lassen sich die Adenylphosphorsäuren durch Phosphatbestimmungen analysieren:

Im Jahre 1925 veröffentlichten C. H. Fiske und Y. Subbarow (1) im Journal of Biological Chemistry einen Test über die Colorimetrische Bestimmung des Phosphors im Blut und Urin. Sie stützten sich bei ihren Arbeiten auf Untersuchungen von Bell und Doisy (2) und anderen amerikanischen Autoren. Diese stützten sich ihrerseits wiederum auf teilweise bis zur Jahrhundertwende zurückreichende Arbeiten deutscher Autoren. Dieser Test hatte aber einige Fehlerquellen an sich und ergab Missweisungen zwischen 4 und 10 % des Totalphosphatgehaltes.

Ein weiterer chemischer Test zur ATP- Bestimmung nach Lohmann (3, 4, 5) beruht auf der hydrolytischen Spaltung mit n- HCl bei 100 Grad und Erfassung des "labilen Phosphats", wobei die Hydrolysedauer auf 7 - 10 Minuten begrenzt wird. (Mit dieser Zeitbegrenzung schlugen sich bereits Fiske und Subbarow herum). Durch Aufnahme von Hydrolysenkurven kann man in Gemischen bekannter Substanzen die einzelnen Komponenten erfassen (3).

In Gewebsextrakten wird allgemein zwischen "freiem Phosphat", "7 - min- Phosphat" oder "labilem Phosphat" und "Restphosphat" unterschieden. Zur ersten Gruppe gehören Orthophosphat und Ribose-1 - Phosphat, zur zweiten Nucleosid- Polyphosphate (ATP), Glucose - 1 - Phosphat und A5MP.

Dieser Test hat sich in der Praxis kaum durchgesetzt, während die Modifikationen der vorgenannten Methode von Fiske und Subbarow (1) die weitaus grösste Verbreitung fanden. Darnach wird das Phosphat in

Phosphormolybdänsäure überführt und diese in schwefelsaurer Lösung mit 1 - Amino - 2 - naphthol - 4 - sulfonsäure zu "Molybdänblau" reduziert, dessen Farbintensität bei 660 - 800 m μ gemessen wird. Da die Geschwindigkeit der Molybdänblaubildung stark p_H - abhängig ist (6), und da vorhergehende saure Aufschlüsse oder Veraschungen mit Schwefelsäure die geforderte Acidität oft überschreiten, verwenden King (7) und Allen (8) Perchlorsäure an Stelle von Schwefelsäure. In Anwesenheit von labilen Phosphaten ergibt die Subbarow - oder King - methode durch Säurespaltung zu hohe Phosphatwerte. Versuche, das Orthophosphat als Barium oder Calciumsalz z.B. von Kreatin- Phosphat (9, 10) abzutrennen, sind meist unbefriedigend.

C.) Colorimetrische und photometrische Bestimmungen

Als weitere Bestimmungsmethoden für ATP entstanden die colorimetrische und photometrische Bestimmung für ATP und ADP von Woodhouse (11). Diese ist eine spezifisch colorimetrische Methode und bedient sich der Zinkreduktion der Adenylsäuren und Kupplung des Reduktionsprodukts mit N- (1-naphtyl -) aethylen-amin-dihydrochlorid. Pirwitz und Haaf modifizierten diesen Test, da ausser Adenin- Derivaten nur Folsäure diazotierbare Reduktionsprodukte liefert. Sie wurde dann zu einem spezifischen ATP + ADP Test, sowohl für Blut als auch für frische Organe (12). Das Absorptionsmaximum der Nucleinsäure- Derivate bei etwa 260 m μ ist für ihre Bestimmung von besonderer Bedeutung.

Wallenfels und Christian (49) haben durch Verwendung einer Quecksilberniederdrucklampe mit Schottfilter und Strahlungsfänger die Wellenlänge 253,7 m μ isoliert und mit dieser Anordnung Purinverbindungen, die entweder durch Elektrophorese, Papierchromatographie oder Ionenaustauscher - Chromatographie getrennt und isoliert wurden, quan-

titativ bestimmt. Spektrophotometrische Bestimmungen werden besonders auch in Kombination mit den noch zu besprechenden enzymatischen Methoden angewandt. Die direkten, photometrischen Messungen von Purin- und Pyrimidinverbindungen enthalten aber auch Fehlermöglichkeiten infolge von Begleitsubstanzen, die z.B. bei der Hydrolyse von Nucleinsäuren oder bei DNS- oder RNS- Bestimmungen auftreten können. (50, 42, 51).

D.) Elektrophoretische Bestimmungsmethoden

Auch die Elektrophorese ermöglicht die Analyse von ATP- Präparaten im Tiselius- Apparat (13). Durch Papier-Elektrophorese lassen sich auch die Abbauprodukte der Nucleinsäuren trennen und bestimmen. (83, 84, 85). Am Rande sei noch die mikropräparative Hochspannungs- Elektrophorese (52) erwähnt.

Papierelektrophoretische Methoden, scheinen gegenüber Papierchromatographie und Chromatographie mit Ionenaustauschern keine Vorteile zu besitzen.

E.) Bestimmungen mittels Ionenaustauscher- Chromatographie

Von Cohn und Carter (14) die Ionenaustauscher- Chromatographie zur Trennung der Adenosinphosphate eingeführt. Sie zeigten, dass AMP, ADP und ATP in einer Säule von Dowex - 1 adsorbiert und nacheinander durch Spülen des Austauschharzes mit verschiedenen molaren HCl und NaCl- Lösungen fraktioniert eluiert werden können.

Deutsch und Nilsson (53) verwenden sinnngemäss den Anionenaustauscher- Dowex - 2 zur Trennung einzelner Inosinphosphate von Adenosinphosphaten. Diese Methode hat weite Verbreitung für die Charakterisierung aller Nucleinsäureverbindungen gefunden und damit wesentlich zur Aufklärung vieler Biochemischer- und Physiologischer Probleme beigetragen. So z.B. in Kombination mit Methoden der Papierchromatographie bei der Entdeckung der 2' : 3' - Isomeren der Ribonucleotide (54).

Potter und Mitarbeiter (55, 56, 57) konnten aus verschiedenen Geweben, Hefe und Tumoren die 5' Mono-, Di- und Triphosphate von Adenosin, Guanosin, Cytidin und Uridin isolieren und auf Grund ihrer UV - Spektren, ihrer chemischen Zusammensetzung und ihres Verhaltens gegenüber der Einwirkung von spezifischen Fermenten und im Ionenaustauscher- Chromatogramm identifizieren.

Zur Anreicherung der labilen Phosphate in Trichloressigsäureextrakten, schaltet Albaum (58) eine Bariumfällung der Austauschchromatographie vor. Spezifischer hierfür sollen Zinkfällungen sein (59), sie können nach Aufnahme in $n\text{-NH}_4\text{OH}$ direkt über eine Dowex - 1 - Säule adsorbiert und anschliessend fraktioniert eluiert werden. Die Reinheitsbestimmung handelsüblicher ATP - oder anderer Nucleotidpräparate gelingt am besten nach diesen Methoden.

Trotz ausgezeichnete theoretisch gegebener Grundlagen, hat sich im Gegensatz zur Ionenaustauscherchromatographie die multiplikative Verteilung nach Craig (60) (unter Verwendung von zwei flüssigen Phasen) zur Trennung von Nucleinsäurederivaten nicht eingebürgert.

F.) Bestimmungsmethoden mittels Papierchromatographie

Auch die Papierchromatographie der Adenylsäurederivate wurde von Consden, Gordon und Martin (15) neu eingeführt und sehr bald für den Nachweis der Nucleinsäurederivate eingesetzt. Verschiedene

Methoden zur Ermittlung der an sich ungefärbten Substanzflecke auf dem Papierchromatogramm wurden speziell entwickelt.

1.) Lokalisation und Erkennung:

Hotchkiss (61) konnte durch Photometrie einzelner 3-5 mm breiter Querstreifen eines Purinchromatogramms die Lage der Purinareale feststellen. Einfacher war jedoch die Behandlung des Chromatogramms mit Quecksilbersalzlösung und der Nachweis des an die Purinflecke gebundenen Quecksilbers mittels Schwefelwasserstoff (62). Boser (63) verwandte zum Adeninnachweis Folins - Reagens. Als letzte Methode sei hier noch der Radioaktive Nachweis von Nucleotiden genannt der mittels Autoradiographie gemacht wird (64, 65, 66).

Am bequemsten lassen sich die auf dem PC lokalisierten Purine und Nucleotide- unter Substanzerhaltung - mit dem Photoprintverfahren nach Markham und Smith (67) erkennen. Da alle Purinverbindungen im UV bei etwa 260 m μ absorbieren, bleiben Purinflecke bei entsprechender Durchleuchtung dunkel oder zeichnen sich im Photodruck als helle Flecke ab. Als Lichtquelle dient hierzu eine Quecksilberlampe mit 2 Filtern (Nickelsulfatlösung und Chlorgas), welche nur die Quecksilberlinien 253,7 und 265 m μ durchlassen. Bei Verwendung einer Hanauer Sterisol-UV - Lampe genügt auch die Vorschaltung eines Schott'schen Uviolfilters (49). Niedervolt- Quecksilberlampen lassen die Nucleinsäurekomponenten auch direkt mit einer Empfindlichkeit von 1-5 Gamma pro Verbindung sichtbar werden (86). Durch Fluoreszenzlöschung der UV - absorbierenden Nucleinsäureverbindungen steigt die Empfindlichkeit des Nachweises. Nach Besprühen mit Fluoreszeinlösung (68) fluoresziert das Papier grün-gelb, während die Purinflecke dunkel bleiben. Eine weitere Empfindlichkeitserhöhung ist durch Eosin oder Quecksilberalkohol bis zu 0,2 Gamma zu erzielen.

2.) Differenzierung:

Im PC können nicht nur Nucleinsäurederivate im allgemeinen sondern auch Phosphate und zuckerhaltige Verbindungen festgestellt werden. Zur Sichtbarmachung aller phosphorhaltigen Areale werden die trockenen

Chromatogramme mit dem Molybdat-Reagens nach Hanes und Isherwood (69) besprüht, 7 Minuten bei 85 Grad Cels. gehalten und anschließend mit Schwefelwasserstoff oder mit ungefiltertem UV-Licht (70) behandelt. Das gebildete "Molybdänblau" (siehe auch Fiske und Subbarow), charakterisiert die phosphorhaltigen Stellen.

Fleckenstein, Gerlach und Janke (71) fanden im Ammoniak-Resistenztest eine bequeme Unterscheidungsmöglichkeit zwischen leicht (ATP, ADP und anorg. Phosphat) und schwer hydrolysierbaren Phosphorverbindungen (AMP, IMP). Erstere geben als Salze eine gegen Ammoniak resistente Blaufärbung. Der Nachweis einer mit Perjodat reagierenden Zuckerkomponente (in diesen Arealen wird Perjodat reduziert, die anschließende Kaliumjodid-Stärkereaktion ist negativ), differenziert spezifisch alle Nucleoside von den entsprechenden Purinen (72, 73).

3.) Quantitative Bestimmung:

Die Nucleinsäurederivate werden durch Messung der Extinktion im UV-Absorptionsmaximum der betreffenden Verbindung nach Extraktion der PC-Flecke mit n/10 Salzsäure (62, 61, 74) quantitativ bestimmt. Phosphorverbindungen im PC werden elektrophotometrisch bei 750 m μ nach Berenblum und Chain (75) im Anschluss an die feuchte Veraschung der ausgeschnittenen phosphorhaltigen Areale ermittelt (72, 73).

4.) Lösungsmittel:

Zur Erkennung und Identifizierung der Nucleinsäurederivate im PC dienen im allgemeinen die Bestimmung des R_f-Wertes, die Vergleichs-chromatographie und die Mischchromatographie mit Testsubstanzen. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die verwendeten Lösungsmittel. Nucleotide wandern wegen ihrer grossen Wasserlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln kaum. In wässrigen Pufferlösungen ist die Trennfähigkeit gering, deshalb werden die Flecken unscharf. Im "Zweiphasenverfahren", z.B. Lösung von sekundärem Natriumphosphat und Isoamylalkohol (76, 77, 78) erzielt man hingegen scharfe Flecke.

Eggleton und Hems (79) benutzten zur besseren Abtrennung der anorganischen Phosphate von AMP, ADP, und ATP zwei verschiedene Lösungsmittel in zwei Trennungsgängen nach einer Laufrichtung, ein Verfahren, das später von Fleckenstein und Janke (80, 81, 82) nach zwei Laufrichtungen modifiziert wurde. Im ersten Lösungsmittel (Isopropylaether - Ameisensäure) bleiben bei aufsteigender Chromatographie ATP und ADP an der Startlinie, AMP wandert wenig, am weitesten anorganisches Phosphat. Nach Trocknung des Papiers werden die weitergewanderten Phosphate oberhalb der Startlinie abgeschnitten und die Chromatographie der Nucleotide und Nucleoside in umgekehrter Richtung in einem zweiten Lösungsmittel (n - Propylalkohol - wässriges Ammoniak) entwickelt.

G.) Enzymatische Bestimmungsmethoden

Als für die klinische Praxis bedeutendste Methoden haben sich die enzymatischen Methoden erwiesen. Zur Verwendung kommen Desaminasen und Phosphokinasen, die entweder in geeigneten Pufferlösungen allein oder in Fermentketten auf das zu bestimmende Substrat zur Einwirkung kommen. Die Messung der Reaktion erfolgt entweder nach chemischen Methoden oder spektrophotometrisch durch Messung der Extinktionsänderung im Absorptionsmaximum der untersuchten Verbindung. Seit mehr als einem Jahrzehnt, aber nach dem von Warburg entwickelten zusammengesetzten optischen Test (16).

Dem bereits 1929 von Embden und Schmidt (17) angewandten Desaminasentest fehlte leider noch die Spezifität. Erst Kalkar (18) verwandte hochgereinigte 5' - Adenylsäuredesaminase, welche die Reaktion



katalysiert und bestimmte bei 265 mμ die Abnahme der molekularen Extinktion von 5' - AMP. Die Kopplung dieser Reaktion an weitere Abbaureaktionen (19) führt zur Bestimmung der Summe von Adenosin + AMP + ADP + ATP.

Weitere enzymatische Tests werden mit spezifischer Adenosin-desaminase aus Darmschleimhaut durchgeführt, welche die Reaktion $\text{Adenosin} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Inosin} + \text{NH}_3$ katalysiert (20, 21).

Schon seit längerem werden Phosphatasen zur enzymatischen Dephosphorylierung an Stelle der sauren Hydrolyse angewandt (22), aber erst in neuerer Zeit gelang es mit hochgereinigten, zum Teil auch kristallisierten Fermenten, eine optimale Spezifität der Reaktionen zu erreichen. Für die Bestimmung und den Stoffwechsel der Nucleinsäurederivate sind unter anderem folgende Phosphatasen von Bedeutung:

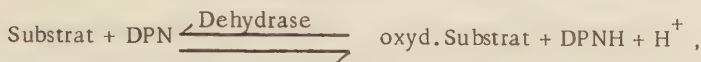
die Myosin- Adenosin- Triphosphatase (Ca^{++} -
aktivierbare ATP - ase) aus Kaninchenmuskel
spaltet mit Myosin als Substrat ATP in ADP + P.

Das abgespaltene anorganische Phosphat wird nach vorgenannten Methoden (1. 8) colorimetrisch bestimmt. Diese Phosphatase ist allerdings nicht für ATP spezifisch, da sie auch die endständigen Phosphatgruppen von ITP und UTP mit annähernd gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert. Zur spezifischen ATP- Bestimmung benützt man daher vorzugsweise die Mg^{++} - aktivierbare Muskel - ATP - ase (Kielley u. Meyerhof) (23) aus Kaninchenmuskeln mit einem pH - Optimum von 6,8 - 7.

Aus dem Rahmen der Phosphokinase- Fermentreaktionen fällt die Reaktion mit Myokinase oder ATP - Phosphomutase aus Skelettmuskeln (24. 25). Sie katalysiert die Reaktion : $2 \text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$ nach rechts, wenn eines der Reaktionsprodukte in weiteren Umsetzungen (ATP mit Hexokinase oder ATP - ase) verbraucht wird. Im System ATP - ase $\rightarrow$ Myokinase $\rightarrow$ Hexokinase kann ATP spezifisch bestimmt werden. Mit ähnlichen Fermentketten wird auch ATP in Hefe und Blut bestimmt (26).

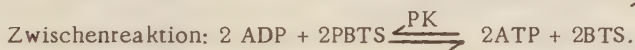
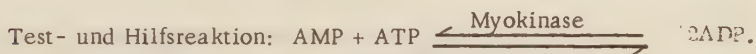
Von besonderer biologischer Bedeutung ist ATP - Kreatin- Transphosphorylase aus Kaninchenmuskeln (27), welche die Phosphorylierung von Kreatin nach $\text{ATP} + \text{K} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{K} \sim \text{P}$ und im gekoppelten System mit Hexokinase die Bestimmung von 0,5 - 5,0 μM ADP und ATP ermöglicht.

Der von mir in dieser Arbeit verwandte Test von Lamprecht basiert in seinen Grundlagen auf Untersuchungen und Entwicklungen von O. Warburg (28. 16). Warburg entwickelte den sogenannten "zusammengesetzten optischen Test" für Wasserstoffübertragende Fermente:



wobei die Konzentration des gebildeten DPNH an der Intensität der spezifischen Absorptionsbande bei 284 mμ gemessen wird. Die photometrisch messbare DPNH - Reaktion kann mit sogenannten Hilfsreaktionen stöchiometrisch an andere zu bestimmende Fermentreaktionen gekoppelt und wenn die Gleichgewichtslage ungünstig liegt durch "Fängerreaktionen" zum vollständigen Ablauf gezwungen werden.

Adam entwickelte auf einen Vorschlag von Bücher (29) und Holzer eine streng spezifische ATP - Bestimmung auf der Grundlage folgender Enzymatischer Kettenreaktionen:

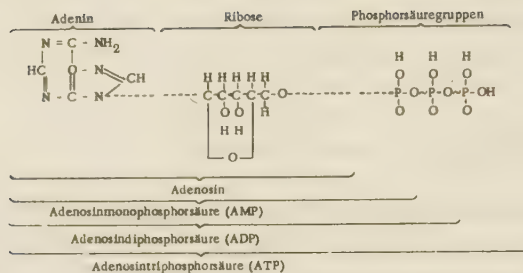


(PBTS = Phosphoenolbrenztraubensäure BTS = Brenztraubensäure,

MDH = Milchsäuredehydroase, PK = Pyruvatkinase, MS = Milchsäure).

Die Bilanzgleichung ergibt die Oxydation von 2 Mol DPNH pro Mol AMP. Im AMP - Bestimmungsansatz befinden sich PBTS und DPNH im Überschuss, ATP in katalytischer Menge. Durch sukzessiven Zusatz der beteiligten Fermentkatalysatoren in der Reihenfolge MDH, Pyruvatkinase, Myokinase, können in dem zu untersuchenden Material folgende Substanzen bestimmt werden: BTS, ADP, AMP. Pyruvatkinase und MDH werden nach Beisenherz und Bücher (30) kristallin erhalten, Myokinase nach Colowick und Kalckar hergestellt.

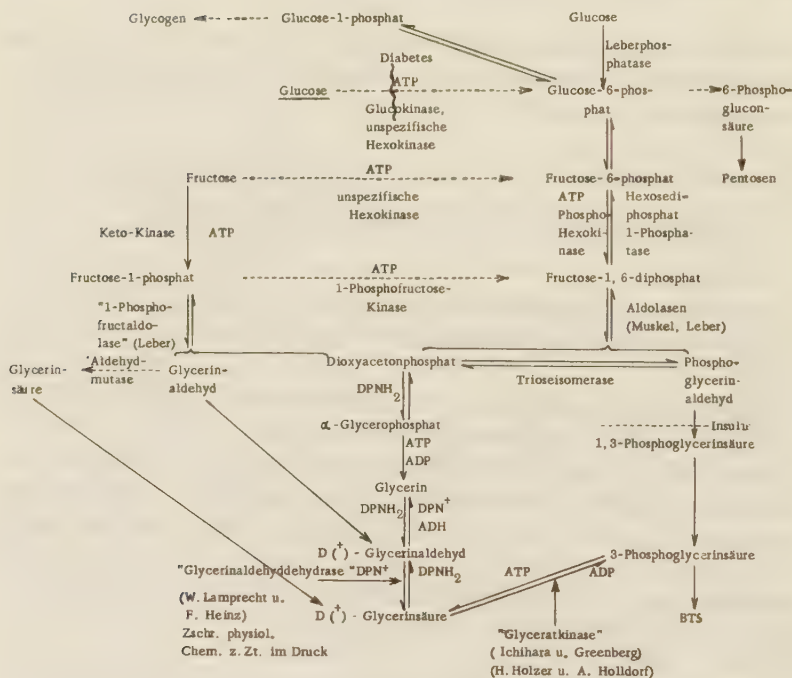
Zum Schluss sei noch erwähnt, dass die Glühwürmchen-Lumineszenz (Luciferase) einen sehr empfindlichen ATP - Nachweis (bis 10^{-10} g) ermöglicht (31).



Die Rolle der ATP im

FRUCTOSESTOFFWECHSEL.

(nach W. Lamprecht und
F. Heinz) (34)

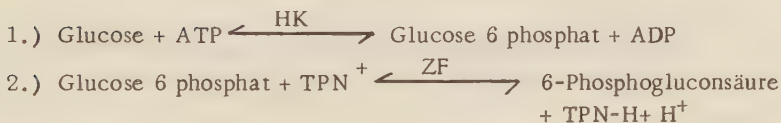


II EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A.) Zur Methodik

Der in dieser Arbeit verwandte Test zur Bestimmung von ATP in Blut und anderem organischen Material, beruht in seiner Basis und den Prinzipien der dabei verwandten Reaktionen auf Veröffentlichungen von O. Warburg (16) und A. Kornberg (32). Er ist ein äusserst spezifischer ATP Test mit folgender Wirkungsweise: (36)

ATP phosphoryliert Glucose unter dem katalytischen Einfluss der Hexokinase (HK) zu Glucose - 6 - phosphat und Bildung von ADP. Das entstandene Glucose - 6 - phosphat wird mit TPN und dem WARBURG'schen Zwischenferment (ZF) zu 6- Phosphogluconsäure und TPN - Hyddehydiert. Die Reaktionsketten lauten also:



a.) Bestimmung von ATP aus Blut oder Serum.

Beispiel: 5,0 ml frisch entnommenes Blut (ohne Citratzusatz etc.) werden sofort aus der Injektionsspritze in 5,0 ml kalter (20° Cels.) 0,6 n - HClO₄ gegeben, umgeschüttelt und in der Kälte 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wird in Eis gestellt und unter kräftigem Rühren mit zwei n- KOH auf pH ca. 7,0 - 7,4 gebracht. (Tüpfeln). Das Volumen verbrauchter KOH wird abgelesen. Man lässt den neutralisierten Überstand 10-15 Minuten in Eis stehen, bis sich der gesamte KClO₄ - Niederschlag abgesetzt hat. Man dekantiert ab (nicht filtrieren!) und belässt die Lösung weiterhin in Eis. Von diesem Überstand werden 0,1 - 0,2 ml zum optischen Test verwandt.

Mit Serum wird analog verfahren.

b.) Bestimmung von ATP aus organischem Material.Beispiel Rattenleber:

Die Ratte wird mit einem Scherenschlag decapitiert, die Leber möglichst schnell herausgenommen, kurz mit Eiswasser abgespült und auf Filterpapier abgetrocknet.

1 Gramm Leber wird mit 4,0 ml kalter 0,6 n - HClO_4 im Potter- Homogenisator oder Warringblendor homogenisiert (1:4) und 10 Minuten bei hoher Umdrehungszahl in der Kälte zentrifugiert (am besten bei 15000 U/ min). Das Neutralisieren des Überstandes erfolgt wie im vorher beschriebenen Beispiel.

Lösungen zur ATP Bestimmung:

1.) TPN^+ : 10 mg TPN in 5,0 ml bidest. Wasser ^{x)}

2.) Hexokinase: 15 mg Ferment in 1,0 ml bidest. Wasser ^{x)};

nur soviel Lösung ansetzen, wie pro Tag benötigt wird - nach ca. 3 Tagen ist das gelöste Ferment inaktiviert.

3.) Zwischenferment:

Suspension des Fermentes in 2,0 m- Ammonsulfat ^{x)}. Ca.
3,5 mg Protein / ml = ca. 620 E/ml.

4.) Glucose:

0,5 m - Lösung ^{x)}

5.) Magnesiumchlorid:

0,1 m - Lösung.

6.) TRIS- Puffer:

0,02, pH = 7,4.

x) Ständig in Eiswasser oder im Eisschrank aufbewahren.

Zu 1. 2. und 3. Wir danken Herrn Dipl. Chem. Dr. W. Lamprecht von der Technischen Hochschule, München (Organisch-Chemisches Institut) für die freundliche Überlassung der Substanz.

Beispiel eines optischen Testes:

Küvette d = 2 cm., Gerät "Eppendorf", Wellenlänge nm = 334.

In die Küvette werden nacheinander pipettiert:

	0,1	-	0,2 ml. neutral. Überstand
	4,0 ml		TRIS-Puffer
	0,2 ml		Glucose- Lösung
	0,05 ml		TPN - Lösung
	<u>0,05 ml</u>		Hexokinase - Lösung
Start :	0,05 ml		Zwischenferment - Lösung.

Berechnung des ATP - Gehaltes

d	= Schichtdicke der Küvette
Vol _{ges}	= Gesamtvolumen in der Küvette
Vol _{test}	= Pro Küvette einges. ATP -Testlösung (Überstand)
Vol _{über}	= Gesamtvolumen enteweisster Lösung + ml KOH x)
Vol _{Blut}	= Volumen enteweisstes Blut (1g Leber = 1 ml)
E	= Abgelesene Extinktionsdifferenz in E/1000

Formel:

$$\frac{100 \cdot E \cdot \text{Vol}_{\text{ges}} \cdot 507 \cdot \text{Vol}_{\text{über}}}{622 \cdot \text{Vol}_{\text{test}} \cdot d \cdot 743 \cdot \text{Vol}_{\text{Blut}}} = \frac{\text{gamma ATP-H}_4}{\text{ml Blut bzw. g. Organ}}$$

x) Als Vol_{über} verstehen wir das tatsächliche Gesamtvolumen der enteweissten Lösung, also ohne Berücksichtigung des Niederschlages. z.B.: bei Blut:

Vol_{über} = 5,0 ml Blut + 5,0 ml HClO₄ + ml verbrauchter KOH ;
 z.B. bei Leber: Vol_{über} = 1 g Leber = 1 ml + 4,0 ml HClO₄ + ml verbrauchter KOH.

Bemerkungen:

Die Fermentreaktion ist in 10-12 min abgelaufen. Bei den angegebenen Konzentrationen wird unter normalen Verhältnissen eine Extinktionsdifferenz zwischen 30 - 50 (E + 1000) erreicht. Dafür sind die eingesetzten Fermentkonzentrationen berechnet. Es soll auf keinen Fall soviel ATP eingesetzt werden, dass eine höhere Extinktionsdifferenz als 50 resultiert ! Kontrolle der optimalen Bedingungen: Bei Einsetzen der Hälfte

der zu testenden Lösung muss genau die halbe Extinktionsdifferenz erreicht werden. Im Falle solange die Testlösung verdünnen, bis diese Proportionalität gegeben ist.

Extinktionssprung : Beim Start des optischen Testes mit Zwischenferment ergibt sich nach Zugabe des Fermentes ein sog. "Extinktionssprung". Im oben angeführten Beispiel beträgt dieser genau + 9 E/1000. Dieser Wert muss natürlich vom Endwert abgezogen werden. Es empfiehlt sich bei verschiedenartigem Material diesen "Extinktionssprung" jeweils zu bestimmen. Z. B. : 0,2 ml neutr. Überstand + 4,8 ml TRIS-Puffer- auf Marke "O" einstellen- nach Zugabe von 0,05 ml Zwischenferment Ermittlung des "Extinktionssprunges".

In der angegebenen Formel wird die freie Säure von ATP ermittelt (Mol. gew. 507) = $\text{ATP} - \text{H}_4$.

Ab einer bestimmten Phosphatationenkonzentration wird der ATP- Test gehemmt. Deshalb keinen Phosphatpuffer verwenden. Auch gegen die Verwendung des sog. "TRAP- Puffers" (Triäthanolamin) bestehen Bedenken im zeitlichen Ablauf der Reaktion. Der angegebene ATP- Test erlaubt natürlich nicht nur eine Konzentrationsbestimmung von ATP, sondern ebenso die von Glucose- 6 - phosphat, TPN und Glucose. Weiterhin dient der Test der Aktivitätsmessung der Hexokinase und des Zwischenfermentes. Als Fermenteinheit E des Zwischenfermentes wird festgelegt:

Eine Enzymeinheit E ist die Enzymmenge, die bei 25° C die TPN - H - Extinktion bei 334 nm in 100 Sekunden um 0,100 (= 100 E/1000) ändert, bezogen auf 1,0 ml und die 10 mm Küvette. Die spezifische Aktivität des Enzymes = E/mg Enzym.

B.) Erfahrungen und Kritik der Methodik

Während der Arbeit mit dem Test ergaben sich einige Änderungen der Methodik, die im Folgenden beschrieben werden sollen:

Zunächst zur Bestimmung von ATP aus Blut oder Serum:

Es wurden nur 4 ml Blut i. v. abgenommen und mit 4 ml kalter HClO_4 umgeschüttelt, da die PVS-Zentrifugenbecher nur maximal 9 ml fassten. Diese Zentrifugenbecher waren deshalb so klein, da mit einer Kältezentrifuge bei 15 000 U/min gearbeitet wurde. Ferner ergab sich, dass tunlichst bei einem pH- Wert zwischen 7,3 und 7,5 gearbeitet wurde. Die Reaktion lief bei diesem pH rascher vollständig ab und der Überstand blieb länger haltbar.

Zu den Lösungen ist folgendes zu sagen: Lösung 1 und 3 wurden gewöhnlich nach 3 Tagen neu angesetzt, spätestens aber nach 8 Tagen. Lösung 4 wurde alle 8, längstens aber nach 14 Tagen erneuert.

Als Puffer wurde nach kurzer Zeit TRIS-Puffer mit Magnesium- Versenat verwandt, der sich als wesentlich günstiger als der reine TRIS-Puffer erwies.

Der optische Test wurde mit folgenden Änderungen gemacht: Küvette d - 1 cm, Gerät "Eppendorf", Wellenlänge nm = 334, in die Küvette wurden nacheinander pipettiert:

	0,05 - 0,1	ml. neutral. Überstand
	2,0 ml	TRIS-Puffer mit Magnesiumversenat
	0,1 ml	Magnesiumchlorid-Lösung
	0,2 ml	Glucose-Lösung
	0,025 ml	TPN- Lösung
	<u>0,025</u> ml	Hexokinase-Lösung
Start:	<u>0,025</u> ml	Zwischenferment-Lösung.

Zum Schluss sei hier die letzte Verbesserung des von W. Lamprecht und J. Trautschold angegebenen Testverfahren zitiert (35):

"dabei werden drei Substratkonzentrationen mit Hilfe einer enzymatisch- optischen Messung gleichzeitig ermittelt.

Der Adenosintriphosphat - Gehalt (ATP) der Leberproben wurde mit der gekoppelten Hexokinase - Zwischenferment- Reaktion bestimmt (36). Zusammensetzung der Messlösung : 0,025 ml TPN^+ - Lsg. (2mg / ml), 4,0 ml Triäthanolamin- Puffer (m/20; pH 7,6), 0,3 ml MgCl_2 - Lsg. (0,1 m), 0,4 ml Glucose - Lsg. (0,5 m), 0,2 bzw. 0,1 ml "Leberaufschluss"; 1. Enzymzugabe 0,05 ml Zwischenferment-Lsg. (50), geringe Extinktionszunahme durch enthaltenes Glucose-6-phosphat; 2. Enzymzugabe 0,05 ml Hexokinase-Lsg. (15 mg/ml); Reaktionsende ca. 10 min. Schichtdicke der Küvette $d = 20$ mm.

Brenztraubensäure (BTS), Dihydroxyacetonphosphat (DOAP) und Fructose - 1,6 - diphosphat (FDP) wurden in einem Küvettenansatz bestimmt. Zusammensetzung der Messlösung : 2,0 bzw. 4,0 ml Triäthanolamin-Puffer (m/20; pH 7,6), 0,05 ml DPN-H-Lsg. (10 mg/ ml) 4,0 bzw. 2,0 ml "Leberaufschluss" ;

- 1.) Enzymzugabe 0,05 ml Milchsäuredehydrase-Lsg. (50) =
BTS - Bestimmung ; Testende 4-5 min. ;
- 2.) Enzymzugabe 0,05 ml 8 Glycerophosphatdehydrase (50) =
DOAP - Bestimmung ; Testende ca. 6 min. ;
- 3.) Enzymzugabe 0,05 ml Aldolase - Lsg. (50) =
FDP 8 Bestimmung ; Testende ca. 10 min. ;
Schichtdicke der Küvette $d = 40$ mm. "

C. Testergebnisse

Als Testbeispiel eines gesunden Menschen soll mein eigenes Beispiel stehen:

Es wurden 4 ml Blut mit 4 ml HClO_4 versetzt.

(Diese Zahlenangabe wird immer gemacht, da bei einigen Patienten die Abnahme von mehr als 2 ml Blut unmöglich war).

Überstand: 5,0 ml

3nKOH 0,545 ml

eingesetztes

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung : von 305 bis 321 = 16

t_0 321 t_7 362 von t_{12} bis t_{20} blieb der abgelesene

t_1 331 t_9 364 Wert konstant. Er bewegte sich

t_2 344 t_9 365 wie folgt zurück:

t_3 351 t_{10} 366 t_{22} 366 t_{40} 348

t_4 356 t_{11} 366 t_{24} 365 t_{50} 337

t_5 358 t_{12} 367 t_{25} 364

t_6 360 t_{13} 367 t_{30} 360

Als Gesamtextinction von t_0 bis t_{12} ergab sich ein $\Delta_{E12} = 46$, das nach

Umrechnung mittels der zum Test gehörigen Formel ein Gamma von 272,2 γ /ccm. Blut ergab.

Als weitere Ergebnisse sollen hier stehen:

Patient H. Ikterus

4 ml Blut + 4 ml HClO_4

Überstand: 5,4 ml

3nKOH 0,630 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $8\Delta_{E19} = 19 = 113,55 \gamma$ /ccm Blut

Patient M., Leberzirrhose.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,9	ml
3nKOH	0,680	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$10 \Delta_{E_{14}} = 21 = 126,23 \gamma/\text{ccm Blut}$	

Patient H. P. 64 Jahre Atrophische Leberzirrhose.

Bemerkung: Krankheitszustand sehr schwer.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,6	ml
3nKOH	0,680	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$10 \Delta_{E_{20}} = 47 = 282,53 \gamma/\text{ccm Blut}$	

Patientin Sch. Leberzirrhose.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,7	ml
3nKOH	0,735	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$4 \Delta_{E_{20}} = 17 = 102,19 \gamma/\text{ccm Blut}$	

Patient H., Diabetes. (128 mg % Blutzucker)

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,8	ml
3nKOH	0,770	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$11 \Delta_{E_{15}} = 20 = 121,46 \gamma/\text{ccm Blut}$	

Patient G. P., Lungeninfarkt und Herzinsuffizienz.

2 ml Blut + 2 ml HClO_4		
Überstand	2,7	ml
3nKOH	0,361	ml
HClO_4	0,005	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung :	$18 \Delta_{E_5} = 25 = 151,17 \gamma/\text{ccm Blut}$	

Gesunder S.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,6	ml
3nKOH	0,64	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$3 \Delta_{E_5}$	$= 33 = 200 \gamma/\text{ccm Blut}$

Patient H. L., Myodegeneratio cordis.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,9	ml
3nKOH	0,830	ml
6 % HClO_4	0,02	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$11 \Delta_{E_4}$	$= 40 = 249 \gamma/\text{ccm Blut}$

Patient H. K., Multiple Sklerose.

4 ml Blut + 4 ml HClO_4		
Überstand	5,8	ml
3nKOH	0,700	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$16 \Delta_{E_7}$	$= 58 = 356 \gamma/\text{ccm Blut}$

Des weiteren wurden Versuche über das Schicksal von Lävulose bei intravenöser Injektion angestellt. Diese sahen folgende Reihenfolge vor:

Erste Blutabnahme: Vor der Injektion
 Zweite " 5 Minuten nach Injektion
 und weitere Blutabnahmen in Abständen von je
 5 Minuten bis insgesamt 25 Minuten.

Gesunder G. M. nüchtern 56 kg. schwer: intravenöse Injektion von 60 ccm 40 % iger Lävulose innerhalb 5 Minuten.

1.) Blutabnahme vor Injektion

2 ml Blut + 2 Ml HClO_4		
Überstand	2,9	ml
3nKOH	0,380	ml
Filtrat	0,1	ml
Extinctionssprung:	$10 \Delta_{E_{10}}$	$= 16 = 97,06 \gamma/\text{ccm Blut}$

2.) Blutabnahme 5 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 2,85 ml

3nKOH 0,375 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $11\Delta_{E15} = 23 = 139,86 \gamma/\text{ccm Blut}$

3.) Blutabnahme 10 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 2,9 ml

3nKOH 0,380 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $11\Delta_{E12} = 23 = 139,86 \gamma/\text{ccm Blut}$

4.) Blutabnahme 15 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 2,8 ml

3nKOH 0,370 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $8\Delta_{E16} = 20 = 121,04 \gamma/\text{ccm Blut}$

5.) Blutabnahme 20 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 2,0 ml

3nKOH 0,420 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $8\Delta_{E14} = 25 = 153,04 \gamma/\text{ccm Blut}$

6.) Blutabnahme 25 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,390 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung $8\Delta_{E12} = 25 = 152,00 \gamma/\text{ccm Blut}$

Gesunder N. T. 60 kg. schwer : intravenöse Injektion von 60 ccm.
40 %iger Lävulose innerhalb 5 Minuten.

1.) Blutabnahme vor Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,363 ml

6 % HClO_4 0,005 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung : $13\Delta_{E_{17}} = 40 = 241,98 \gamma/\text{ccm Blut}$

2.) Blutabnahme 15 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 2,9 ml

3nKOH 0,351 ml

Extinctionssprung: $5\Delta_{E_{18}} = 64 = 385,65 \gamma/\text{ccm Blut}$

3.) Blutabnahme 20 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,395 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $7\Delta_{E_{13}} = 37 = 225,21 \gamma/\text{ccm Blut}$

Patient H. R. 100 kg. schwer, Oesophaguskarzinom, intravenöse Injektion von 60 ccm 40 % iger Lävulose innerhalb 4 Minuten.

1.) Blutabnahme vor Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,1 ml

3nKOH 0,371 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $13\Delta_{E_{11}} = 49 = 296,63 \gamma/\text{ccm Blut}$

2.) Blutabnahme 10 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,1 ml

3nKOH 0,398 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $13\Delta_{\text{E}_9} = 57 = 347,20 \text{ } \mu\text{/ccm Blut}$

3.) Blutabnahme 15 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,374 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung : $13\Delta_{\text{E}_9} = 41 = 248,37 \text{ } \mu\text{/ccm Blut}$

4.) Blutabnahme 20 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,383 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $11\Delta_{\text{E}_9} = 50 = 303,52 \text{ } \mu\text{/ccm Blut}$

5.) Blutabnahme 25 Minuten nach Injektion

2 ml Blut + 2 ml HClO_4

Überstand 3,0 ml

3nKOH 0,407 ml

Filtrat 0,1 ml

Extinctionssprung: $8\Delta_{\text{E}_{10}} = 43 = 262,45 \text{ } \mu\text{/ccm Blut}$

Die Auswertung der letzten 3 Tests hat ergeben, dass nach Injektion von Lävulose etwa zwischen 10 und 15 Minuten und zwischen 20 und 25 Minuten ein Ansteigen des ATP-Spiegel im Blut zu beobachten ist, während unmittelbar nach Injektion und etwa zwischen 15 und 20 Minuten nach der Injektion ein Tiefstand zu verzeichnen sind.

LEISTUNGSFÄHIGKEIT

Der Test hat sich über eine nicht unerhebliche Zahl von Versuchen sehr gut bewährt. Besonders angenehm ist dabei aufgefallen, dass die Möglichkeit der wiederholten Rückkontrolle - auch im Zeitraum von 1-3 Tagen nach Abnahme des Substrates und nachfolgender Enteiweissung - jederzeit möglich war.

Als Schwierigkeit ergab sich hingegen die Notwendigkeit, der absoluten Reinheit der in diesem Testverfahren zur Anwendung kommenden Enzyme. Ausserdem war die Empfindlichkeit der gelösten Fermente selbst unter konstanter Temperatur von 0 Grad etwas störend.

ENDURTEIL ÜBER DEN TEST

Der in die klinische Praxis eingeführte Test von W. Lamprecht erwies sich als sehr leistungsfähig und bei Einhaltung der vorgeschriebenen Bedingungen auch als besonders genau. Die Leistungsfähigkeit kommt am besten wohl darin zum Ausdruck, dass die Möglichkeit bestand, von einer Person innerhalb weniger Stunden bis zu 20 Versuche abzuwickeln. Dadurch waren die notwendigen Kontrollen der Substrate innerhalb der gegebenen Frist jederzeit möglich. Ausserdem ergab sich dadurch, dass die Enzyme durch die gleiche Testanordnung wie im Verfahren mit den Substraten, ständig überprüft werden konnten, eine gute Kontrolle.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollten sowohl die literarisch-theoretische Seite als auch die praktisch-klinische Seite der bis heute in Anwendung gekommenen quantitativen und qualitativen Testverfahren zur Bestimmung der Adenosintriphosphorsäure - sowie der mit ihr unmittelbar zusammenhängenden Nucleotide - niedergelegt werden. Des weiteren werden in dieser Arbeit eigene Erfahrungen und Ergebnisse mit dem von W. Lamprecht entwickelten ATP-Test niedergelegt. So wurde der Versuch gemacht nicht nur die praktisch-klinische Brauchbarkeit des Testverfahrens sondern auch seine hohe Zuverlässigkeit herauszustellen. Ausserdem werden in dieser Arbeit Testergebnisse niedergelegt, die unter anderem den ATP-Blutspiegel von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen zeigen sollen. Ausserdem wurde eine Versuchsserie mit Lävuloseinjektionen - i.v. - und anschliessender ATP-Blutspiegelbestimmung über einen gewissen Zeitraum post injectionem gemacht.

LITERATUR

- 1.) Fiske, C.H., Subbarow J., J.Biol.Chem. 66, 375 (1925)
- 2.) Bell, R.D., Doisy, E.A., J.Biol.Chem.
- 3.) Lohmann, K., Biochem.Zschr. 194, 306 (1928)
- 4.) Lohmann, K., Biochem.Zschr. 202, 466 (1928)
- 5.) Lohmann, K., Biochem.Zschr. 203, 164 u. 176 (1928)
- 6.) Woods, J.I. Mellon, M.G., Ind. Engng. Chem. anal. Edit. 13, 760 (1943)
- 7.) King, E.J., Biochem.J. 26, 292 (1932)
- 8.) Allen, R.J., Biochem.J. 34, 858 (1940)
- 9.) Eggleton G.P., Eggleton, P., Brit.J.Physiol. 68, 193 (1929)
- 10.) Eggleton, P., Biochem.J. 37, 526 (1943)
- 11.) Woodhouse, D.W., Arch.Biochem. 25, 347 (1950)
- 12.) Baumgarten, B., Diss.Freiburg 1955
- 13.) Bock, R.M., Alberty, R.A., J.Biol.Chem. 193, 435 (1951)
- 14.) Cohn, E.W., J. Amer.Chem.Soc. 71, 2275 (1949); Science 109, 377 (1949); J. Amer. Chem.Soc. 72, 1471 (1950); J. Cellular Comp. Physiol. 38 (Suppl. 1), 21 (1952)
- 15.) Consden, R., Gordon, A.H., Martin A.J.P., Biochem.J. 38, 224 (1944)

- 16.) Warburg, O. "Wasserstoffübertragende Fermente"
- 17.) Embden G., Schmidt, G., Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem.
187, 130 (1929)
- 18.) Kalckar, H. M., J.Biol.Chem. 167, 429 (1947)
- 19.) Albaum H. G., Lipschitz, R.,
Arch.Biochem. 27, 102 (1950)
- 20.) Brady, T., Bain, J. A., Biochem.J. 36, 478 (1942)
- 21.) Brady, T., Bain, J. A., J.Biol.Chem. 195, 685 (1952)
- 22.) Lohmann, K., Schuster, P.,
Biochem. Zschr. 272, 24 (1934)
- 23.) Kielley, W. W., Meyerhof, O.,
J. Biol. Chem. 176 591 (1948)
- 24.) Colowick, S. P., Kalckar, H. M.,
J. Biol. Chem. 148, 117 (1943)
- 25.) Kalckar, N. M., J. Biol. Chem. 148, 127 (1943)
- 26.) Steyn Parvé, E. P., Biochem. biophysica Acta 10, 121
(1953)
- 27.) Colowick, S. P., Kaplan, N. O.,
"Enzymology II"
- 28.) Warburg O., Erg. Enzym-Forschr. 7, 210 (1938)
- 29.) Bücher T., Pfeleiderer, G., unveröffentlicht ; zit. Adam, H.,
Diss.Freiburg 1955
- 30.) Beisenherz, G., Bücher, T. u. a. Zschr. Naturforsch.
8b, 555 (1953)
- 31.) Strehler, B. L., Totter, J. R., in Glick, D.,
"Methods of Biochemical Analysis",
Interscience Publishers j, 341 (1954)

- 32.) Kornberg A., J. Biol. Chem. 182, 780 (1950)
- 33.) K. Boettge, K. H. Jaeger, H. Mittenzwei Arneim. -
Forsch. (Drug Res.) 7, 24-59
(1957)
- 34.) Lamprecht W. und Heinz F.,
Z. physiol. Chem. z. Zt. im Druck
- 35.) Lamprecht W. und Trautschold J.,
Z. physiol. Chem. z. Zt. im Druck
- 36.) Lamprecht W.,
Habilitationsschrift Technische
Hochschule, München
- 37.) Varga, E., Aszodi, L., Kostya, K.,
Kisérl orvostudom 6, 303 (1954)
- 38.) Kerr, S.E., Seraidarian, K., Brown, G.B.,
J. Biol. Chem. 194, 579 (1952)
- 39.) Ceriotti, G., J. Biol. Chem. 198, 297 (1952)
- 40.) Ceriotti, G., J. Biol. Chem. 214, 59 (1955)
- 41.) Euler, v. H., Dtsch. med. Wschr. 73, 265 (1948)
- 42.) Ogur, M., Rosen, G., Arch. Biochem. 25, 262 (1950)
- 43.) Holzer, H., Goldschmid, S., Lamprecht, W., Helmreich, E.,
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.
Chem. 297, 1 (1954)
- 44.) Marshak, A., Vogel, H.J.,
J. Biol. Chem. 189, 597 (1951)
- 45.) Larsen, Svensk, klin. tidskr. 54, 61 (1942)
- 46.) Umbreit, W.W., Burris, R.H., Stauffer, J.F.,
"Manometrical Technic and Tissue
Metabolism" Burgess Publishing Co.,
Minneapolis, 1951

- 47.) Kossel, A., Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem.
10, 248 (1886) ; 12, 241 (1888)
- 48.) Burian, R., Ber.Chem.Ges. 37, 696 (1904)
- 49.) Wallenfels, K., Christian, W.,
Angew. Chem. 65 459 (1953)
- 50.) Giri, K.V., Krishnaswamy, P.R., Kalyanker, G.D., Rao, P.L.N.,
Experientia 9, 296 (1953)
- 51.) Ogur, M., Minckler, S., Lindegren, G., Lindegren, C.C.,
Arch.Biochem.Biophys. 40, 175
(1952)
- 52.) Wieland, T., Pfeleiderer, G.,
Anges.Chem. 67, 257 (1955)
- 53.) Deutsch, A., Nilsson, R., Acta chem.Scand. 7, 1288 (1953)
- 54.) Cohn, W.E., Carter, C.E.,
J.Amer.Chem.Soc. 72, 4273 (1950)
- 55.) Hurlbert, R.B., Schmitz, H., Brumm, A.D., Potter, V.R.,
J.Biol.Chem. 209, 23 (1954)
- 56.) Schmitz, H., Hurlbert, E.B., Potter, V.R.,
J.biol.Chem. 209, 41 (1954)
- 57.) Schmitz, H., Biochem. Zschr. 325, 555 (1954)
- 58.) Albaum, H.G., The Biology of Phosphorus, Michigan
State College Press. East Lansing 1952,
37.
- 59.) Owens, R.G., Science 122, 415 (1955)
- 60.) Craig, L.C., J.Biol.Chem. 155, 519 (1954)
- 61.) Hotchkiss, R.R., J.Biol.Chem. 175, 315 (1948)
- 62.) Visher, E., Chargaff, E., J.Biol.Chem. 176, 703 (1948) ; 176,
715 (1948)

- 63.) Boser, H., Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem. 298, 145 (1954)
- 64.) Hummel, J.P., Lindberg, O., J. Biol. Chem. 180, 1 (1949)
- 65.) Reichard, P., J. Biol. Chem. 1479, 773 (1949)
- 66.) Hock, A., Huber, G., Biochem. Zschr. 328, 44 (1956)
- 67.) Markham, R., Smith, J.D., Biochem. J. 45, 294 (1949); Nature 163, 250 (1949)
- 68.) Wieland, T., Bauer, L., Angew. Chem. 63, 511 (1951)
- 69.) Hanes, C.S., Isherwood, F.A., Nature 164, 1107 (1949)
- 70.) Bandursky, R.S., Axelrod, B., J. Biol. Chem. 193, 405 (1951)
- 71.) Fleckenstein, A., Gerlach, E., Janke, J., Naturwiss. 40, 462 (1953)
- 72.) Buchanan, J.G., Decker, C.A., Long, A.G., J. Chem. Soc. 1950, 3162
- 73.) Metzenberg, R.L., Mitchell, H.K., J. Amer. Chem. Soc. 76, 4187 (1954)
- 74.) Wyatt, G.R., Biochem. J. 48, 581 (1951)
- 75.) Berenblum, I., Chain, E., Biochem. J. 32, 295 (1948)
- 76.) Carter, C.E., J. Amer. Chem. Soc. 72, 1466 (1950)
- 77.) Montreuil J., Boulanger, P., Compt. rend. acad. sc. 231, 247 (1950); ref. Ber. Physiol. 149, 143 (1952)
- 78.) Snellmann, O., Gelotte, B., Nature 168, 696 (1951)

- 79.) Eggleston, L.V., Hems, R.,
Biochem.J. 52, 156 (1952)
- 80.) Fleckenstein, A., Janke, J.,
Pflügers Arch. Physiol. 258, 177
(1953)
- 81.) Fleckenstein, A., Janke, L., Elke, M.,
Naunyn Schmiedebergs Arch.exper.
Path. 221, 404 (1954)
- 82.) Fleckenstein, A.,
"Der Na-K-Austausch als Energieprin-
zip in Muskel und Nerv" Springer-Ver-
lag, Berlin 1955
- 83.) Dimroth, K., Jaenicke, L., Vollbrechtshausen, Y.,
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol.Chem.
298, 71 (1952)
- 84.) Turba, F., Enenkel, H.J., Naturwiss. 38, 189 (1951)
- 85.) Wade, H.E., Morgan, D.M.,
Biochem.J. 56, 41 (1954)
- 86.) Makino, K., Matsuzaki, K.,
J.Biochem. 41, 457 (1954)

Lebenslauf

Ich Michael Sendtner geb. am 27.1.32 zu München als Sohn der Eheleute Dr. ing. Albert Sendtner und Martha Sendtner geb. Masur besuchte in München die Volksschule an der Schwanthalerstr. bis zu meinem 10. Lebensjahr.

Von dort wechselte ich in die Oberschule an der Damenstiftstr. über, in der ich die beiden ersten Klassen der Oberschule absolvierte. Die dritte Klasse der höheren Schule besuchte ich in Teilen in der Oberschule zu Gräfelfing, in der Oberschule Pasing, Ausweichstelle Herrsching vom September 44 bis April 45. Vom Herbst 45 bis Januar 47 besuchte ich die Oberschule in Pasing, von Februar 47 bis zur Erlangung der Reife im Juni 51, besuchte ich die Oberschule in Weilheim.

Im Wintersemester 51/52 machte ich bei Prof. Falk einen Ehrendienst und konnte das anschliessende Sommersemester 52 durch Erkrankung nicht besuchen. Im Wintersemester 52/53 begann ich mein Studium und bestand das Physikum am 30.4.54 nach 3 Semestern Studium an der Universität München. Noch einmal wurde das Studium nach dem 6. Semester durch einen Unfall unterbrochen und ich bestand am 29. Jan. 58 an der Universität München zur Gänze das Zahnmedizinische Staatsexamen, worauf ich am 15. Februar 58 vom Bayer. Staatsministerium des Innern meine Bestallung als Zahnarzt erhielt.

